

## ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА НА ФОРМИРОВАНИЕ СЕРДЕЧНОГО РИТМА КРЫСЫ ПРИ ТРАНЗИТОРНОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА

С.А. Руткевич, К.М. Люзина, Г.С. Полюхович, А.Г. Чумак

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

### Условные обозначения:

GSH – глутатион восстановленный

GSSG – глутатион окисленный

ЭКГ – электрокардиограмма

ЧР – частота ритма

### Введение

Общеизвестно, что одним из основных факторов антиоксидантной защиты клеток является система глутатиона. Глутатион в организме присутствует в окисленной (GSSG) и восстановленной (GSH) формах. В норме содержание GSSG в тканях и плазме крови млекопитающих поддерживается на уровне, во много раз более низком, чем GSH [1, 2]. За более чем столетнюю историю изучения роли системы глутатиона в регуляции биохимических процессов установлено, что он участвует в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты клеток, превращении витаминов (С, Е, липоевой кислоты и убихинона), регуляции тиолдисульфидного равновесия и синтеза нуклеиновых кислот, обмене ряда эйкозаноидов – простагландинов и лейкотриенов, регулирует синтез белков теплового шока, участвует в развитии апоптоза [3, 4, 5]. В последние годы широко обсуждается сигнальная роль глутатиона. Высказываются гипотезы о его способности предотвращать воздействие на мозг активных форм кислорода и оказывать нейропротекторный эффект [3]. Накапливается все больше сведений о том, что роль системы глутатиона при ишемических повреждениях мозга сложна и многообразна [3, 4, 6]. GSH является одним из основных неэнзиматических антиоксидантов в сердце и, как сообщается, играет жизненно важную роль при защите от ишемии-реперфузии. Установлено, что элементы системы глутатиона специфически экспрессируются в скелетных и сердечной мышцах, регулируют рианодиновый рецептор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и «консервируют» запасы  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазматическом ретикулуле [7]. Многочисленные работы, посвященные исследованию физиологических эффектов глутатиона, свидетельствуют о неоднозначном влиянии экзогенного GSH на повышение его уровня в ткани и улучшение функциональных характеристик сердца в состоянии ишемического инсульта [8, 9, 10]. Полагают, что высокая концентрация GSH в плазме при экзогенном введении может угнетать  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазу и нарушить работу глутамильного цикла [8]. Другие работы указывают на снижение эффективности этой системы в условиях оксидативного стресса и положительные эффекты глутатиона в условиях моделирования экспериментальной ишемии миокарда у крыс [10].

Целью данной работы являлось установление характера влияния окисленного и восстановленного глутатиона на развитие нарушений сердечного ритма крыс в условиях моделирования коронароокклюзионной ишемии-реперфузии.

### Методы исследования

Острые опыты выполнены на 42 белых беспородных крысах обоего пола массой 150–250 г, находящихся под уретановым наркозом (1 г/кг внутривенно). После введения уретана крысы переводились на искусственную вентиляцию легких с заданным ритмом дыхания 60 вдохов в минуту. Затем для обеспечения доступа к органам грудной полости осуществлялась торакотомия. Ишемию миокарда (12 мин) создавали лигированием левой

коронарной артерии на 2 мм ниже ее основания по Н. Selye [11]. Лигатуру подводили атравматической иглой, на артерию накладывали баллончик, над которым лигатуру плотно завязывали. Реперфузию вызывали удалением баллончика и лигатуры. Полноту ишемии оценивали визуально по выраженному побледнению ткани и по изменению параметров ЭКГ (рост амплитуды зубца R, подъем сегмента ST).

ЭКГ регистрировали игольчатыми электродами в первом стандартном отведении, в котором лучше виден подъем сегмента ST, позволяющий судить о развитии переднебоковой ишемии левого желудочка. Правильность положения зубца R на ЭКГ указывало на наличие номотопного синусового ритма сердца. Хаотичное положение зубца R на фоне нарушений ритма свидетельствовало о появлении желудочковых аритмий. На протяжении ишемической и реперфузионной фаз эксперимента учитывали формы желудочковых аритмий (экстрасистолию, тахикардию, трепетание, фибрилляцию), частоту их встречаемости и динамику развития нарушений.

Животные были разделены на 3 группы: контроль ( $n=7$ ), крысы, которым за 10 минут до коронароокклюзии внутривенно вводили GSSG (15 мг/кг и 5 мг/кг,  $n=8$ ) и GSH (15 мг/кг  $n=7$ ).

В отдельной серии экспериментов ( $n=20$ ) регистрировали импульсную активность в афферентных волокнах блуждающего нерва. Для открытия доступа к нервам и органам брюшной полости производилась лапаротомия. Регистрирующие биполярные подвесные электроды из хлорированного серебра располагались на перерезанных и взятых на лигатуры поддиафрагмальных ветвях блуждающего нерва и покрывались вазелиновым маслом. Подогретые до 37°C растворы хлорида натрия (0,9%), аминокислот (10 мг, растворенные в 0,5 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия), глутатиона восстановленного (20 мг, растворенный в 0,5 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия) вводились через катетер в двенадцатиперстную кишку.

Комплекс приборов включал усилитель переменного тока (производство ИТМО НАНБ), компьютер. Использована программа “*Inputwin*”, разработанная в Институте физиологии НАН Беларуси. Данные обработаны статистически с использованием  $t$ -критерия Стьюдента для малых выборок и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считались достоверными при  $P \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В опытах с моделированием ишемии миокарда было установлено, что коронароокклюзия провоцировала развитие разнообразных желудочковых нарушений ритма, которые появлялись с 6-й мин ишемии и сохранялись на высоком уровне до конца ишемического периода.

На рисунке 1а на фрагментах ЭКГ видно, что у крысы контрольной серии желудочковые аритмии появлялись на 7-й мин ишемии и поддерживались до 12-й мин, при этом первоначально возникшая экстрасистолия провоцировала развитие более опасных аритмий – тахикардии (11-я мин) и трепетания (8-я мин) желудочков. На 1-й мин реперфузии отмечалось наибольшее разнообразие форм желудочковых аритмий, вплоть до самых тяжелых – от тахикардии и трепетания (30-я с) до эпизодов фибрилляции (50-я с). На 2–4-й мин реоксигенации тахикардия сохранялась (рисунок 1б). Затем электрическая активность миокарда постепенно нормализовалась: на 5-й мин регистрировались только одиночные и групповые экстрасистолы (рисунок 1б), а с 6-й мин восстановился синусовый ритм.

Таким образом, коронароокклюзия провоцировала развитие многочисленных желудочковых нарушений ритма, которые появлялись с 6-й мин ишемии и сохранялись на высоком уровне до конца ишемического периода. Наибольшая электрическая нестабильность миокарда желудочков отмечалась в первые 2 мин восстановления кровотока, а к 10-й мин реперфузии происходило постепенное восстановление синусового ритма.

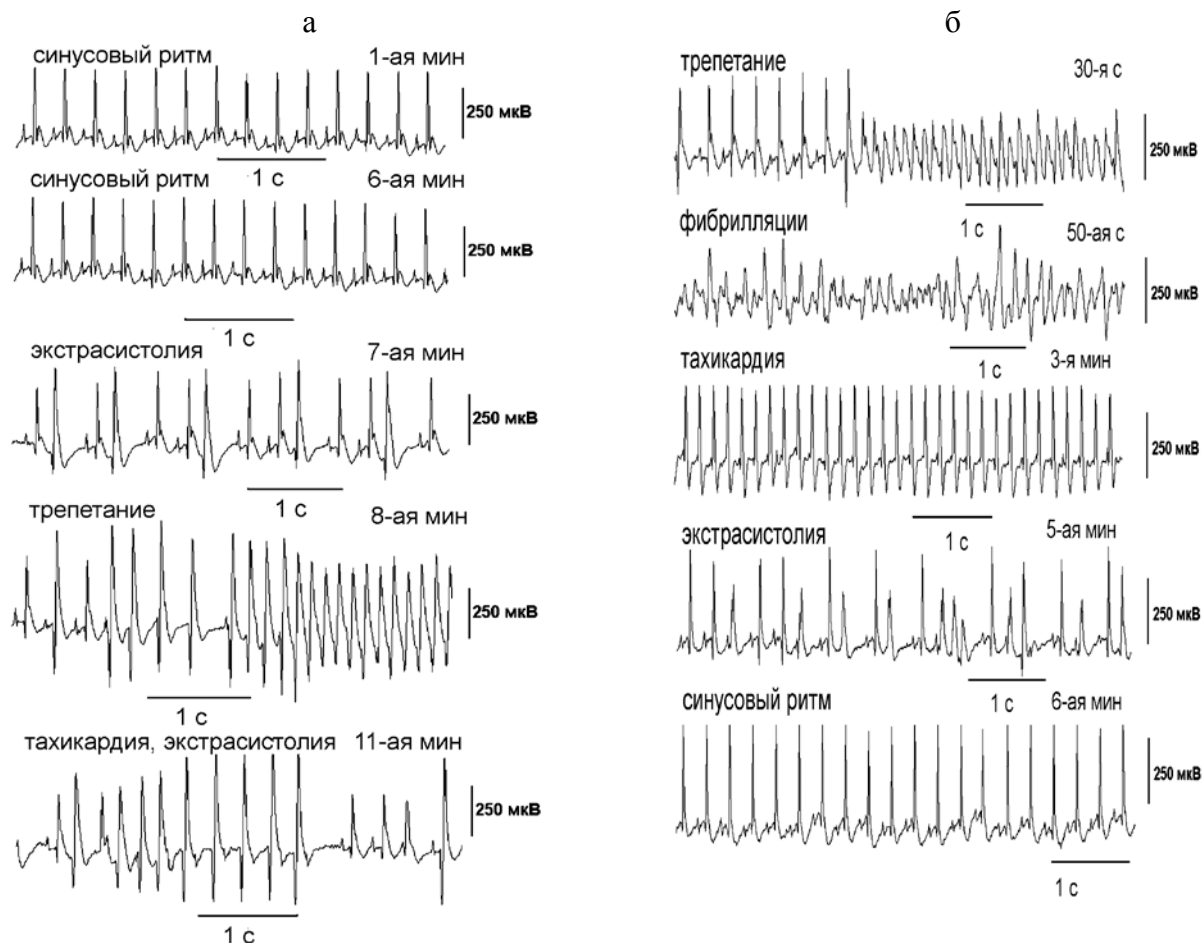


Рисунок 1 – ЭКГ крысы при коронароокклюзионной ишемии (а) и реперфузии (б) миокарда левого желудочка (контроль)

В следующих сериях экспериментов исследовали влияние повышения в крови концентрации окисленного (15 мг/кг и 5 мг/кг) и восстановленного (15 мг/кг) глутатиона на номотопный сердечный ритм наркотизированных крыс, в течение 10 мин после введения влиятелей, а затем после создания коронароокклюзионной ишемии и реперфузии миокарда левого желудочка.

Через 6 мин после введения GSSG (15 мг/кг) отмечалось увеличение ЧР до  $350 \pm 14$  ударов/мин по сравнению с исходной ЧР  $309 \pm 11$  ударов/мин ( $P < 0,05$ ,  $n = 4$ ). Внутривенное введение GSH, в указанной дозе, не вызывало изменения сердечного ритма крыс.

После коронароокклюзии на фоне введения глутатиона окисленного (15 мг/кг,  $n = 4$ ) отмечалось преходящее угнетение электрической активности сердца и развитие нарушений ритма (тахикардия, экстрасистолия), начиная со 2-ой мин ишемии. К 9-ой минуте ишемии регистрировалось трепетание. К 3-5-ой мин реперфузии происходила остановка сердца у всех животных этой серии. Использование меньшей дозы GSSG (5 мг/кг) также сопровождалось нарастающим нарушением электрической активности сердца, развитием тяжелых аритмий (тахикардия и трепетание) (рисунок 2а) и к 8-10-й мин реперфузии приводило к развитию непреходящей фибрилляции и прекращению жизнедеятельности (рисунок 2б).

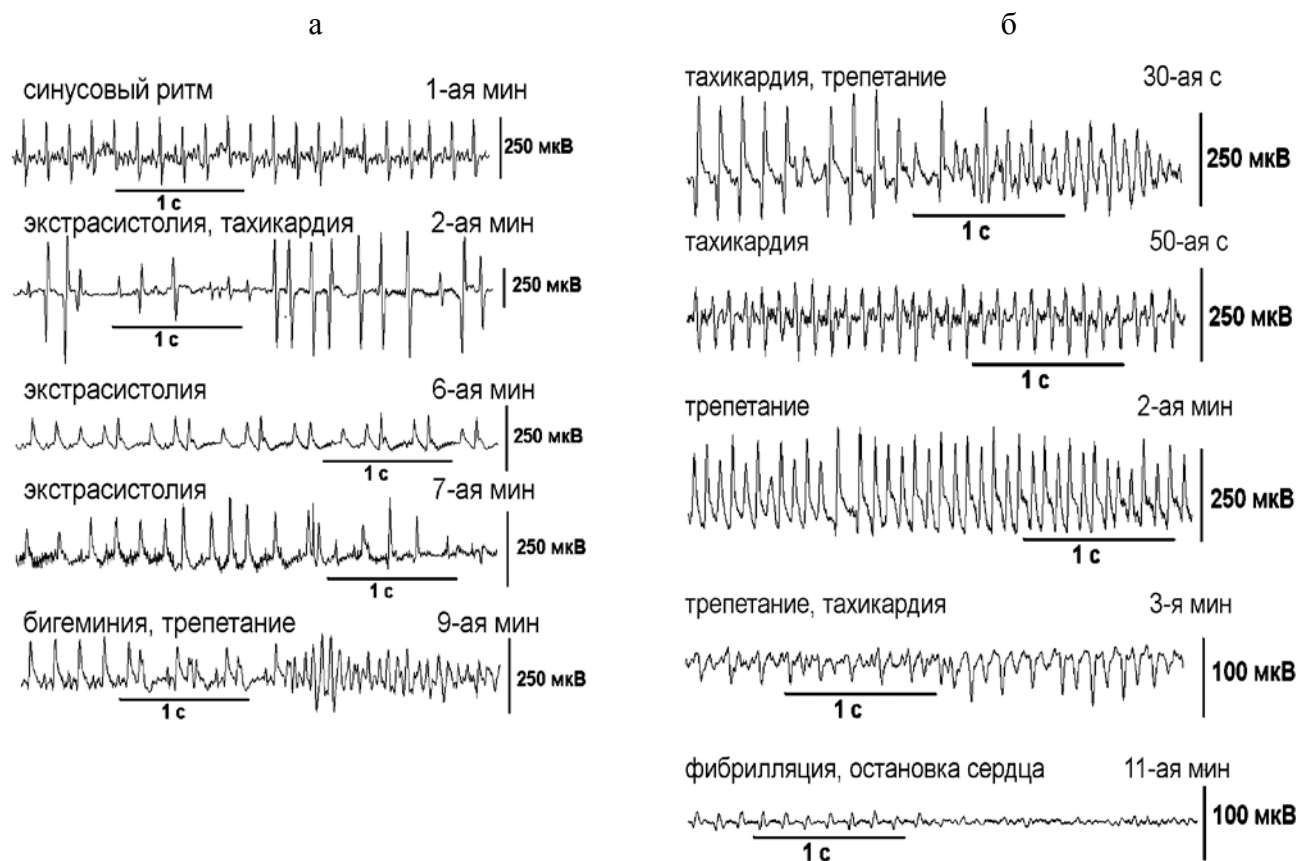


Рисунок 2 – ЭКГ крысы при коронароокклюзионной ишемии (а) реперфузии (б) миокарда левого желудочка после введения глутатиона окисленного (5 мг/кг)

Введение глутатиона восстановленного (15 мг/кг) не модифицировало протекание ишемии миокарда, наблюдалось развитие тех же нарушений ритма, что и в контрольной группе животных. Вместе с тем, отмечалось более раннее восстановление синусового ритма в фазу реперфузии (к 4-ой мин) по сравнению с контрольной группой. Динамика развития нарушений желудочкового ритма в процессе моделирования ишемии-реперфузии приведена на рисунке 3.

Кроме того в процессе восстановления кровотока отсутствовали самые тяжелые формы нарушения ритма, такие как трепетание и фибрилляция желудочков.

Таким образом, введение глутатиона окисленного вызывало более раннее возникновение и нарастание нарушений желудочкового ритма в фазу ишемии и приводило к остановке сердца в фазу реперфузии – к 3-й мин при введении дозы 15 мг/кг и к 11-й мин при инъекции 5 мг/кг. Восстановленный глутатион предотвращал развитие наиболее тяжелых форм нарушения желудочкового ритма – трепетания, фибрилляции и способствовал более раннему восстановлению нормального ритма в фазу реперфузии.

В отдельной серии опытов получены данные, которые свидетельствуют о том, что глутатион (в дозе 20 мг/0,5 мл,  $n=6$ ), цистеин (10 мг/0,5 мл,  $n=5$ ) и глутамат (10 мг/0,5 мл,  $n=5$ ), введенные в двенадцатиперстную кишку, приводят к повышению частоты афферентной сигнализации в блуждающем нерве. Максимальные значения центростремительной импульсной активности составили  $62,8 \pm 5,8$ ;  $33,6 \pm 4,3$  и  $36,8 \pm 5,1$  имп/с для глутатиона, цистеина и глутамата соответственно, при фоновых значениях  $24,7 \pm 0,9$ ,  $25,1 \pm 1,2$  и  $24,8 \pm 1,3$  имп/с. Противоположный по направленности эффект оказывал внутрикишечно введенный глицин (в дозе 10 мг/0,5 мл,  $n=4$ ). Результаты подтверждают высокую активность афферентного звена интероцептивных рефлексов при введении в кишку пищевых раздражителей [12].

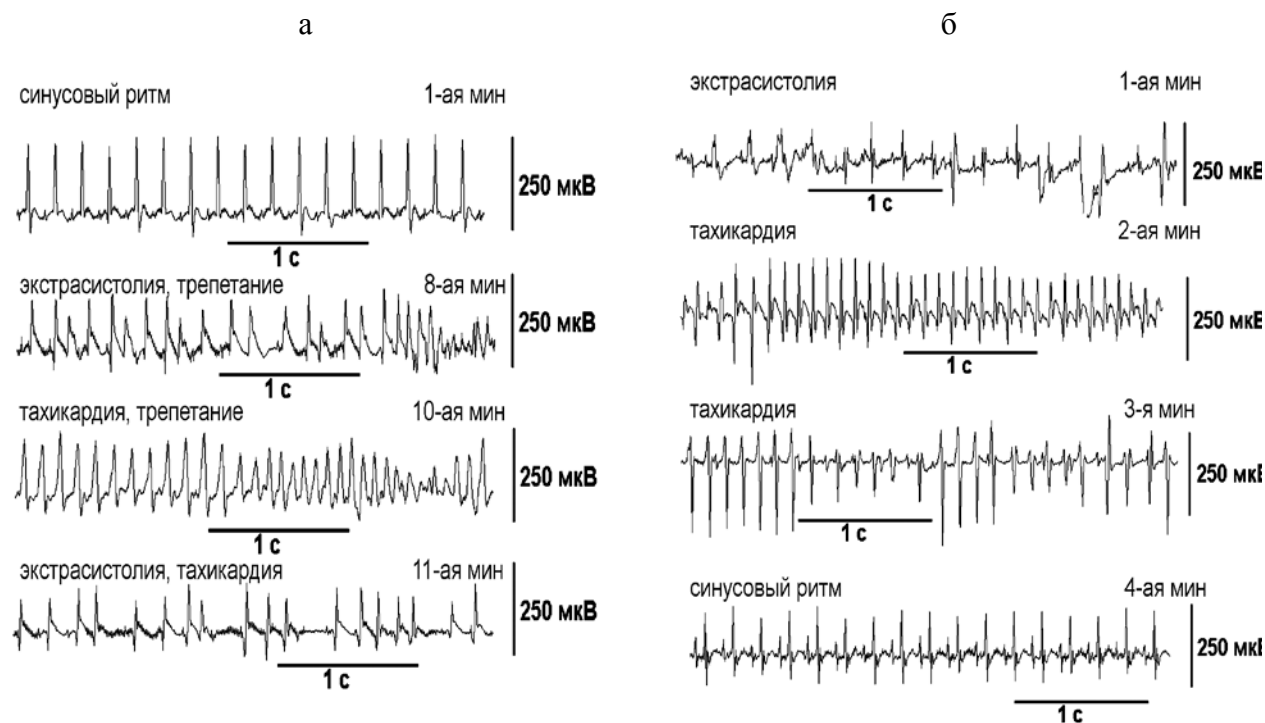


Рисунок 3 – ЭКГ крысы при коронароокклюзионной ишемии (а) реперфузии (б) миокарда левого желудочка после введения глутатиона восстановленного (15 мг /кг)

Изменение частоты осцилляций в афферентных волокнах блуждающего нерва в ответ на внутрикишечное введение GSH позволяет предположить, что глутатион рецептируется в кишке. Полученные результаты не расходятся с данными литературы о всасывании глутатиона в желудочно-кишечном тракте млекопитающих, причем, как свидетельствует тот же источник, транспорт глутатиона через эпителиоциты кишки доминирует над его расщеплением [13]. Факт рецепции GSH может иметь значение для регуляции систем, связанных с поддержанием уровня восстановленного глутатиона в крови, а значит и для контроля токсичности свободных радикалов и перекисей в организме. Уменьшение окислительного повреждения тканей в условиях действия антиоксидантов ассоциируется в литературе с регуляцией уровня артериального давления и сердечной деятельности не только при ишемии, но и в физиологических условиях [14].

Для изучения роли антиоксидантной системы глутатиона в различных моделях патологического состояния, в том числе в условиях ишемии-реперфузии миокарда, используются различные способы изменения уровня тканевого GSH. В одних работах материалы свидетельствуют о том, что истощение тканевого GSH на 30% от нормального значения, особенно в печени, может приводить к увеличению образования активных форм кислорода, изменениям в обмене ксенобиотиков и усилению токсичности электрофилов [3, 8]. На усиление окислительного стресса указывают также работы, в которых применялись деплеторы GSH, усиливающие повреждения, вызываемые ишемией-реперфузией. Другие публикации приводят сведения о высокой эффективности предшественников и производных GSH как протекторов [9, 10]. Однако в литературе есть и противоположные данные – сообщалось, что введение моноэтилового эфира GSH усиливало повреждения ткани в почках, вызванные ишемией [15, 16].

Полученные нами данные указывают на кардиопротекторное действие восстановленного глутатиона, внутривенное введение которого наркотизированным крысам уменьшало выраженность реперфузионных желудочковых нарушений ритма и способствовало более раннему восстановлению синусового ритма в условиях постишемической реперфузии.

Работа выполнена по гранту БРФФИ № Б12ОБ-040.

**Список литературы**

1. Gilbert, H.E. Glutathione Centennial Molecular Perspectives and Clinical Implications / H.E. Gilbert / Ed. A. Meister. – San Diego: Acad. Press. – 1989. – P.73–87.
2. Кулинский, В.И. Система глутатиона. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко / Биомедицинская химия. – 2009. – Том 55, вып. 3. – С. 255–277.
3. Comparative studies on the enzymes of glutathione S-transferase of rat brain and others tissues / S.V. Singh [et. al.] / Comp. Biochem Physiol. – 1987. – 86 B. – P. 73–81.
4. Сотникова, Г.В. Значение системы глутатиона для толерантности к полной ишемии головного мозга : Дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 : Иркутск, 2003 176 с.
5. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляторная патология / Г.Н. Крыжановский / М.: Медицина, 2002. – 632 с.
6. Гусев, Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова – М.: Медицина – 2001 – 328 с.
7. Mazurek, S.R. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release by cytosolic glutathione in rabbit ventricular myocytes / S.R. Mazurek, E. Bovo, A.V. Zima / Free Radic Biol Med. – 2014 –. Vol. 68. – P.159–167.
8. Glutathion S-transferases of the human heart / S.V.Singh [et. al.] / IRCS Med.sci. – 1985. Vol. 13. – P. 973–974.
9. Ramires, P.R. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo / P.R. Ramires, L.L. Ji / American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology. – 2001. – Vol. 281. – P. H679–H688.
10. Sudha, M. Protective effect of glutathione against isoproterenol induced myocardial injury in rats / M. Sudha, D. Rajkumar , J.W. Felix / Indian J. Physiol. Pharmacol. – 2013. – Vol. 57(2). – P. 132–137.
11. Selye, H. Simple techniques for surgical occlusion of coronary vessels in the rat / H. Selye, E. Bajusz, F.A. Grasso / Angiology. – 1960. – Vol. 11. – P. 398–408.
12. Люзина, К.М. Сенсорная рецепция нутриентов в кишке при адекватной субстратной нагрузке / К.М. Люзина, Н.Н. Пехота, Д.В. Велесницкая, А.Г. Чумак / «Фундаментальные науки и современная медицина» Материалы международной научно-практической конференции – Минск: Экономпресс, 2012. – С. 184–187.
13. Linder, M. Transport of Glutathione by Intestinal Brush Border Membrane Vesicles / M. Linder, G. DeBurler, P. Sudaka / Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1984. – Vol. 123 – P. 929–936.
14. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension / J. Redon [et al.] / Hypertension. – 2003. – Vol. 41. – P. 1096–1101.
15. Raza, H. Short-term effects of nose-only cigarette smoke exposure on glutathione redox homeostasis, cytochrome P450 1A1/2 and respiratory enzyme activities in mice tissues / H. Raza, A. John, A. Nemmar / Cell Physiol Biochem. – 2013. – Vol. 31, № 4–5. – P. 683–692.
16. Deleve, L.D. Importance and regulation of hepatic glutathione / L.D. Deleve, N. Kaplowitz / Seminars in Liver Disease. – 1990 – № 10 – P. 251–266.